

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 678 274

②1 N° d'enregistrement national :

91 07780

⑤1 Int Cl : C 07 H 15/252; A 61 K 31/70

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25.06.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 31.12.92 Bulletin 92/53.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : MEDGENIX GROUP (S.A.) — BE.

⑦2 Inventeur(s) : Ledet Brigitte et Baurain Roger.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schimpl
Warcin Ahner.

⑤4 N-Leucyl Epirubicine application à Titre de médicament antitumoral et procédé de préparation.

⑤7 La présente invention a pour objet le composé N-L-
Leucyl-Epirubicine, ainsi que ses sels pharmaceutique-
ment acceptables.

La présente invention a également pour objet un procédé
de préparation desdits composants et son application à ti-
tre de médicament antitumoral.

FR 2 678 274 - A1

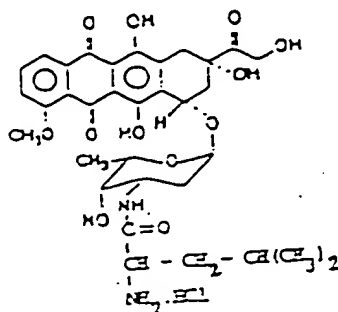


19253
#9

La toxicité de substances antimitotiques constitue un des grands problèmes rencontrés dans la chimiothérapie du cancer. Les médicaments anti-tumoraux n'exercent pas uniquement leur effet cytotoxique sur les cellules cibles. Ils s'attaquent également aux tissus sains entraînant l'apparition d'effets secondaires indésirables et limitant les doses utilisées.

Ainsi parallèlement à une myélotoxicité, caractéristique des substances antimitotiques, la Doxorubicine, agent à large spectre d'activité thérapeutique, est cardiotoxique à doses cumulatives. La recherche d'analogues ou de dérivés de la Doxorubicine a donc pour but principal d'en réduire la toxicité.

On peut citer comme exemple la Leurubicine ou N-L-Leucyl-Doxorubicine (2).



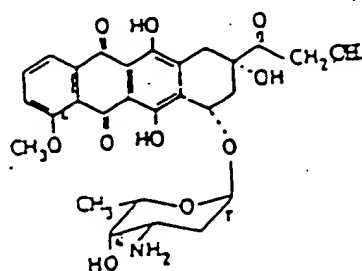
Prologue de la Doxorubicine, la Leurubicine montre dans les études précliniques à dose équimyélotoxique une activité supérieure à la Doxorubicine et une cardiotoxicité réduite.

L'Epirubicine présente les mêmes caractéristiques toxicologiques que la Doxorubicine. Elle offre toutefois l'avantage d'être légèrement moins cardiotoxique.

L'Epirubicine est un analogue semisynthétique de la Doxorubicine modifié au niveau du sucre : on y observe une inversion de la stéréochimie du groupe Hydroxyle porté par le carbone C-4' (Conformation L-arabinose du sucre aminé dans l'Epirubicine est L-lyxo dans la Doxorubicine).

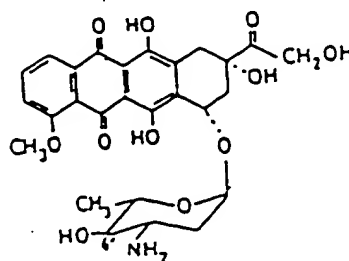
Le groupe hydroxyle C'-4 de l'Epirubicine présente donc une orientation équatoriale.

10



15

Doxorubicine

3

Epirubicine

4

20

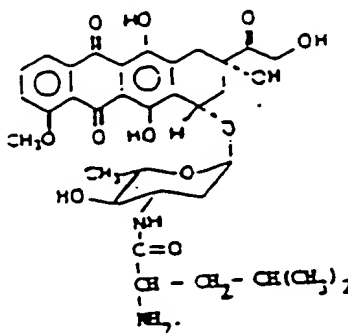
Le but de la présente invention est d'obtenir un nouveau dérivé ou analogue de la Doxorubicine de manière à en réduire la toxicité tout en conservant ou si possible en élargissant son activité antinéoplasique par modification de la spécificité tissulaire et modulation des propriétés pharmacocinétiques.

25

30

35

Pour ce faire, la présente invention fournit un nouveau dérivé de l'Epirubicine, la N-L-Leucyl-Epirubicine, de formule I :



ainsi que les sels pharmaceutiquement acceptables un procédé de préparation et les compositions anti-cancéreuse contenant ce produit.

La présente invention a également pour but de procédé de préparation de la L-leucyl-épirubicine qui soit simple, d'une mise en oeuvre aisée, applicable à des quantités importantes de produits de départ pouvant être de l'ordre de 10g et surtout conduisent à des rendements supérieurs à 80%.

Les inventeurs ont mis en évidence que le choix particulier des groupements fluorényl-méthoxy carbonyle en tant que groupe protecteur de la fonction amine de la leucine permet d'une part de simplifier et, d'autre part, d'optimiser considérablement la préparation de la N-leucyl-épirubicine.

C'est pourquoi, de préférence selon l'invention, la la N-L-Leucyl-Epirubicine est obtenue par condensation de l'ester activé de la N-Fmoc-Leucine et de l'Epirubicine base suivie de la déprotection de la fonction aminée en milieu basique. Le produit est lyophilisée sous forme de chlorhydrate.

Dans un mode de réalisation, le procédé comporte les étapes suivantes :

1) à la Fmoc-leu dissoute dans le DMF, on ajoute un équivalent de N-hydroxybenzotriazole et un équivalent de dicyclohexylcarbodiimide pour obtenir un ester active de la N-Fmoc-Leu.

2) à l'Epirubicine base dissoute dans le DMF, on ajoute 1, 2 équivalents de l'ester active dans le N-Fmoc-leu pour obtenir la N-Leu-Epirubicine N-protégée.

3) la fonction aminée du résidu leucine est déprotégée par addition de diéthylamine en solution dans le DMF.

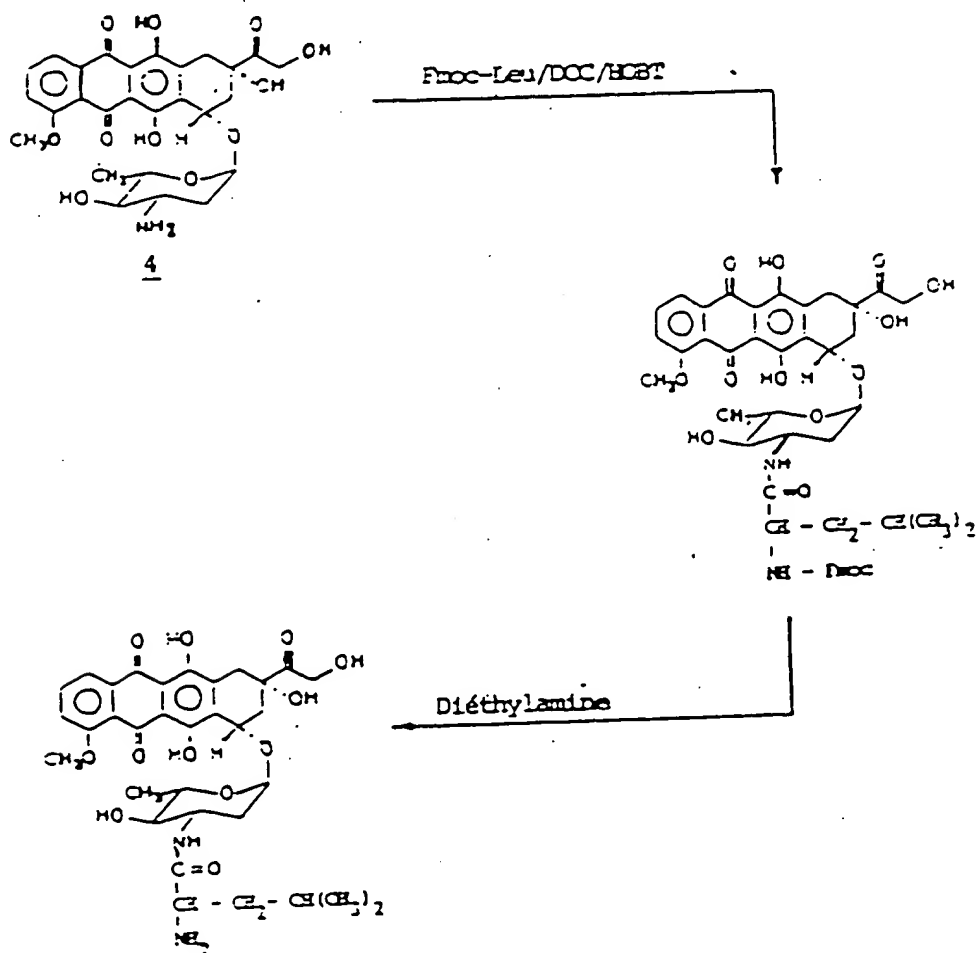
15

20

25

30

35



Le caractère prodigue de la N-L-Leucyl-Epirubicine a été mis en évidence dans des tests de libération du principe actif, l'épirubicine, en présence d'une peptidase purifiée, la leucine aminopeptidase ou de sang humain et d'érythrocytes. La leucine aminopeptidase est présente dans le cytosol et les mitochondrie de nombreuses cellules.

Après incubation durant 4H à 37°C (ph 7) en présence de Leucine aminopeptidase microsomale, on observe au départ de N-L-Leucyl-Epirubicine la libération de 50% d'Epirubicine (figure I). Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec ceux obtenus pour la Leurubicine (figure II). Cette dernière montre toutefois une vitesse d'hydrolyse plus rapide après 4H d'incubation en présence de Leucine aminopeptidase.

Dans le sang complet, 33% de la N-L-Leucyl-Epirubicine sont hydrolysés en Epirubicine 22% et aglycone 11%. En présence de globules rouges isolés, on observe la même transformation tandis que dans le plasma, aucune formation d'Epirubicine n'est observée. La dégradation en aglycone y est prépondérante (figure III).

Des résultats quantitativement comparables ont été enregistrés avec la Leurubicine, précurseur de la Doxorubicine (figure IV) qui démontrent par conséquent l'avantage d'une substitution N-Leucyle sur l'Epirubicine en termes de baisse de toxicité par rapport à celle-ci, au même titre que la Doxorubicine (figure IV).

D'autres avantages et caractéristiques apparaîtront à la lumière de la description qui va suivre :

25

Les figures I et II représentent l'hydrolyse respectivement de la leu-Epirubicine et la Leurubicine par la leucine aminopeptidase microsomale. Les figures III et IV représentent l'hydrolyse in vitro respectivement de la leu-Epirubicine et Leurubicine à 37°C dans le sang total, les érythrocytes et le plasma.

30

35

EXEMPLE 1 = Préparation de la N-L-Leucyl-Epirubicine

1.1. Obtention de la base libre de l'Epirubicine.

5 Le chlorhydrate de l'Epirubicine est dissous dans du tampon bicarbonate (pH 8.5). La base libre est extraite au chloroforme. La solution séchée sur sulfate de sodium et le solvant évaporé.

1.2. Activation de la N-Fluorénylméthoxyloxycarbonyl Leucine (Fmoc-Leu)

10

 A la Fmoc-Leu dissoute dans le DMF, on ajoute à 0°C un équivalent de N-hydroxybenzotriazole (HOBT) et un équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). La solution est agitée pendant 10 minutes à 0°C.

15

1.3. Préparation de la N-L-Leucyl-Epirubicine

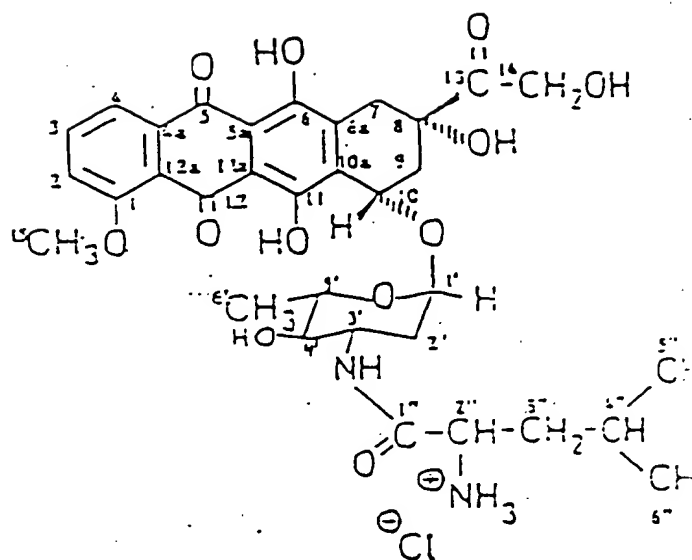
 A l'Epirubicine base dissoute dans le DMF, on ajoute à température ambiante 1, 2 équivalents de l'ester activé de la N-Fmoc Leu. 20 La solution est agitée durant 1 heure à température ambiante. Après évaporation de la DMF, la (N-Leu-Epirubicine) N-protégée est purifiée par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 98/2. La fonction aminée du résidu Leucine est déprotégée par addition sous argon à -15°C de 3 équivalents de 25 didétylamine en solution dans le DMF. Après évaporation du DMF, la N-Leucyl-Epirubicine est précipitée à l'éther. Après lavage en milieu acide et basique, la N-Leucyl-Epirubicine est lyophilisée sous forme de chlorhydrate.

30

35

5 N-L-LEUCYL EPIRUBICINE: $^1\text{H-RMN}$

10
15
Structure :



5

I . PROTON RMN : Solvant DMSO-d Spectre
 Tableau 1 : Spectre RMN de la Leu-épirubicine

	Proton	Déplacement chimique (DMSO comme référence)	Mult.	J(Hz)	Int.
	6+11	14 to 13	2 br.s.	-	2H
10	NH 3'	8.45	d	8.23	1H
	NH ₂ "2"	8	br.s.	-	3H
	3+4	7.78	m	-	2H
	2	7.55	d	7.7	1H
	OH8	5.49	s	-	1H
15	1'	5.18	s	-	1H
	OH4'	5.03	d	6.45	1H
	10+OH14	4.9	m	-	2H
	14	4.57	br.s.	-	2H
20	15	3.92	s	-	3H
	5'	3.88	m	-	1H
	3'	3.80	m	-	1H
	2"	3.61	t	7	1H
	H ₂ O	3.36	s	-	-
25	4'	3.01	m	-	1H
	7A	2.93	d	18.3	1H
	7B	2.84	d	18.2	1H
	9	2.13	m	-	2H
30	2' _A =eq.	1.90	m	-	1H
	ax=2' _B +3''+4''	1.68 to 1.4	m	-	4H
	6'	1.19	d	6	3H
	5''+6''	0.85	2d	7.05	6H

35

EXEMPLE 2 . Hydrolyse Enzymatique in vitro de la N-L-Leucyl-Epirubicine

2.1. Hydrolyse par la leucine aminopeptidase.

5 La N-L-Leucyl-Epirubicine à une concentration de 20µ/ml est incubée dans du tampon phosphate pH 7 en présence de 2 unités/ml de Leucine aminopeptidase (microsomale). Des aliquots sont prélevés après 30mn, 1H, 2H, 4H et 6H.

10 Après addition d'un volume équivalent aux aliquots prélevés de tampon borate 0,1 M, pH 9, les dérivés anthracyclines sont extraits à l'aide d'un mélange chloroforme/méthanol : 4/1. Les différents échantillons sont analysés par HPLC en phase normale (colonne : Si-60, Eluant : chloroforme-méthanol-acide acétique-MgCl₂ 0,3 mM : 1450-450-80-60, V/V/V/V).
15 La détection est faite par fluorescence, extinction : 480 µm, émission : 560 µm. Les résultats comparés à ceux obtenus avec la N-L-Leucyl-Doxorubicine sont repris dans la figure I.

2.2 Hydrolyse dans le sang.

20 300 µl d'une solution de N-L-Leu-Epirubicine dans NaCl 0,9% à une concentration de 1 mg/ml de NaCl 0,9% sont ajoutés à 2,7ml de sang humain héparinisé.

25 Le mélange est incubé à 37°C et des aliquots sont prélevés au temps 0, 2H et 4H. Les dérivés anthracyclines sont extraits à l'aide d'un mélange chloroforme/méthanol : 4/1 après addition d'un volume équivalent aux aliquots prélevés de tampon borate 0,1 M, pH 9. Les différents échantillons sont analysés par HPLC en utilisant les mêmes conditions que
30 celles décrites en 2.1. Les résultats obtenus sont repris dans la figure III.

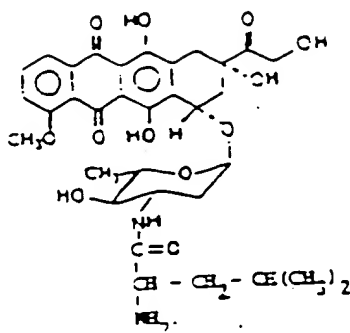
EXEMPLE 3 . Hydrolyse en présence d'érythrocytes

Les érythrocytes ont été séparés du plasma par centrifugation (10 min, 3291 g, 4°C). Ils sont ensuite lavés par trois cycles de résuspension dans l'eau physiologique et centrifugation. Lors du premier cycle, la partie supérieure de la couche d'érythrocytes contenant les globules blancs est éliminée. Après la dernière centrifugation, 1,3 ml de globules rouges sont prélevés et suspendus dans un volume identique d'eau physiologique avant d'être mis en présence de N-L-Leu-épirubicine.

Le procédé suivi est identique à celui décrit en 2.2. Les résultats obtenus sont repris dans la figure III.

REVENDICATIONS

- 1 - Composé N-L-Leucyl-Epirubicine, de formule 1 :



ainsi que ses sels pharmaceutiquement acceptables.

- 2 - Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que il est obtenu par condensation de l'ester activé de la N-Fmoc-Leucine et de l'Epirubicine suivie de la déprotection de la fonction aminée en milieu basique.
- 3 - A titre de médicament antitumoral le composé selon la revendication 1 un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

1 / 3

HYDROLYSE DE LA LEU-EPIRUBICINE ET DE LA LEURUBICINE PAR
LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE MICROSOMALE

1. Leu-épirubicine

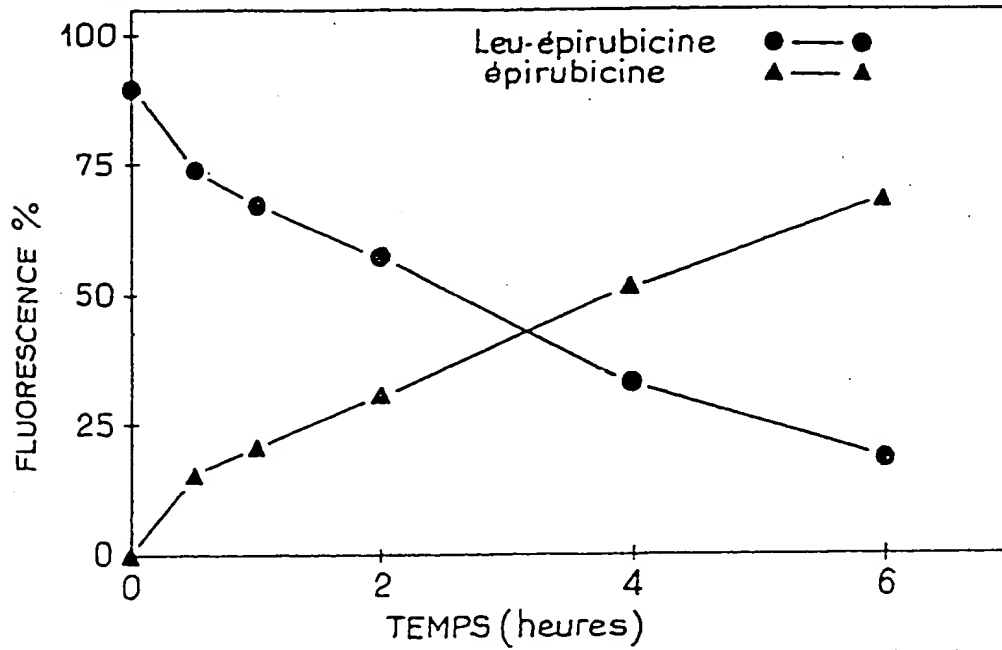


FIG. 1

2. Leurubicine

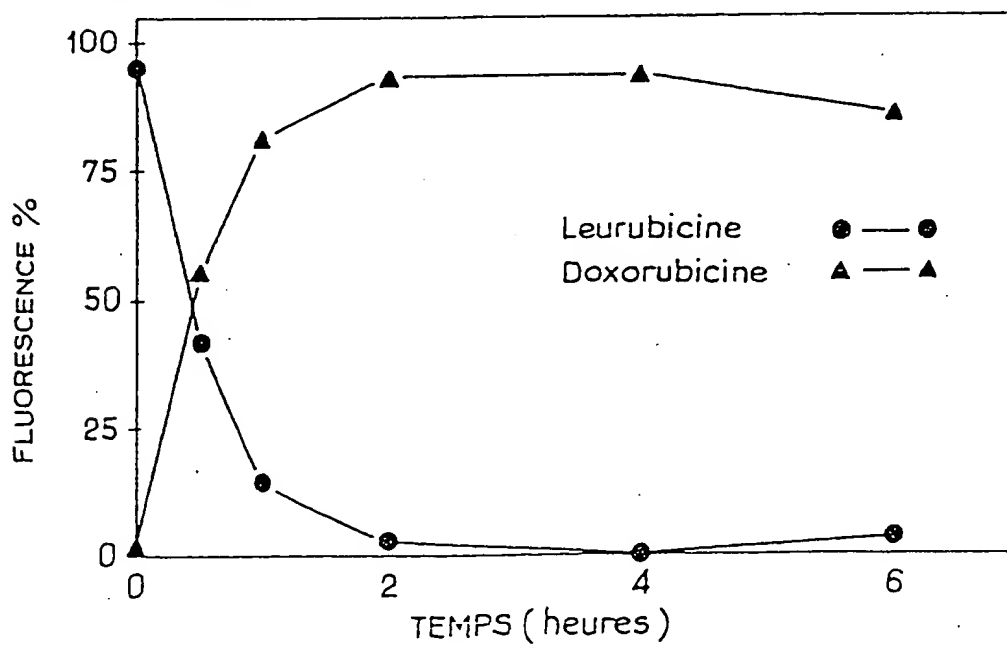


FIG. 2

2 / 3

HYDROLYSE IN VITRO DE LA LEU-EPIRUBICINE A 37 C

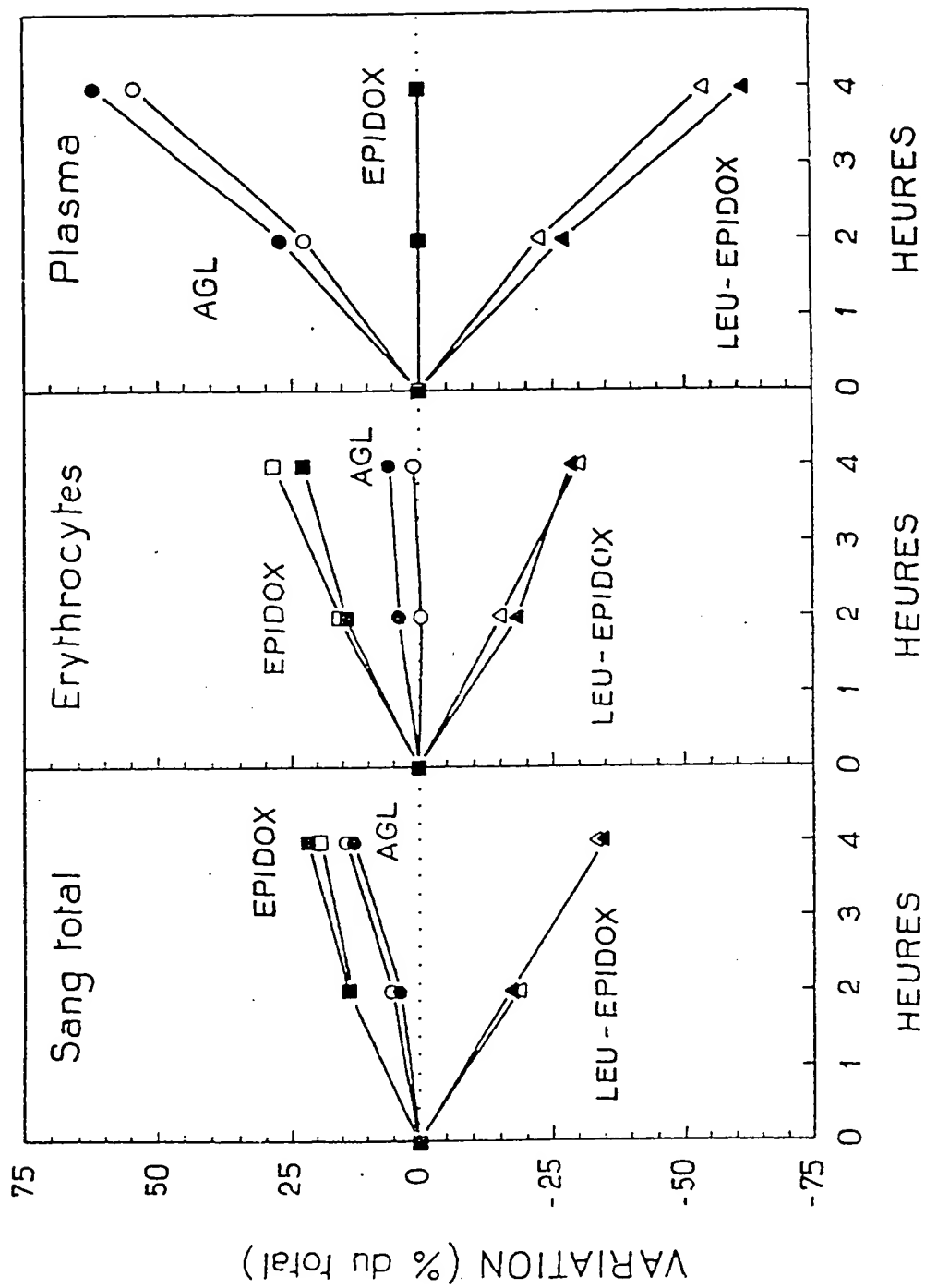


FIG. 3

3 / 3

HYDROLYSE IN VITRO DE LA LEURUBICINE a 37 C.

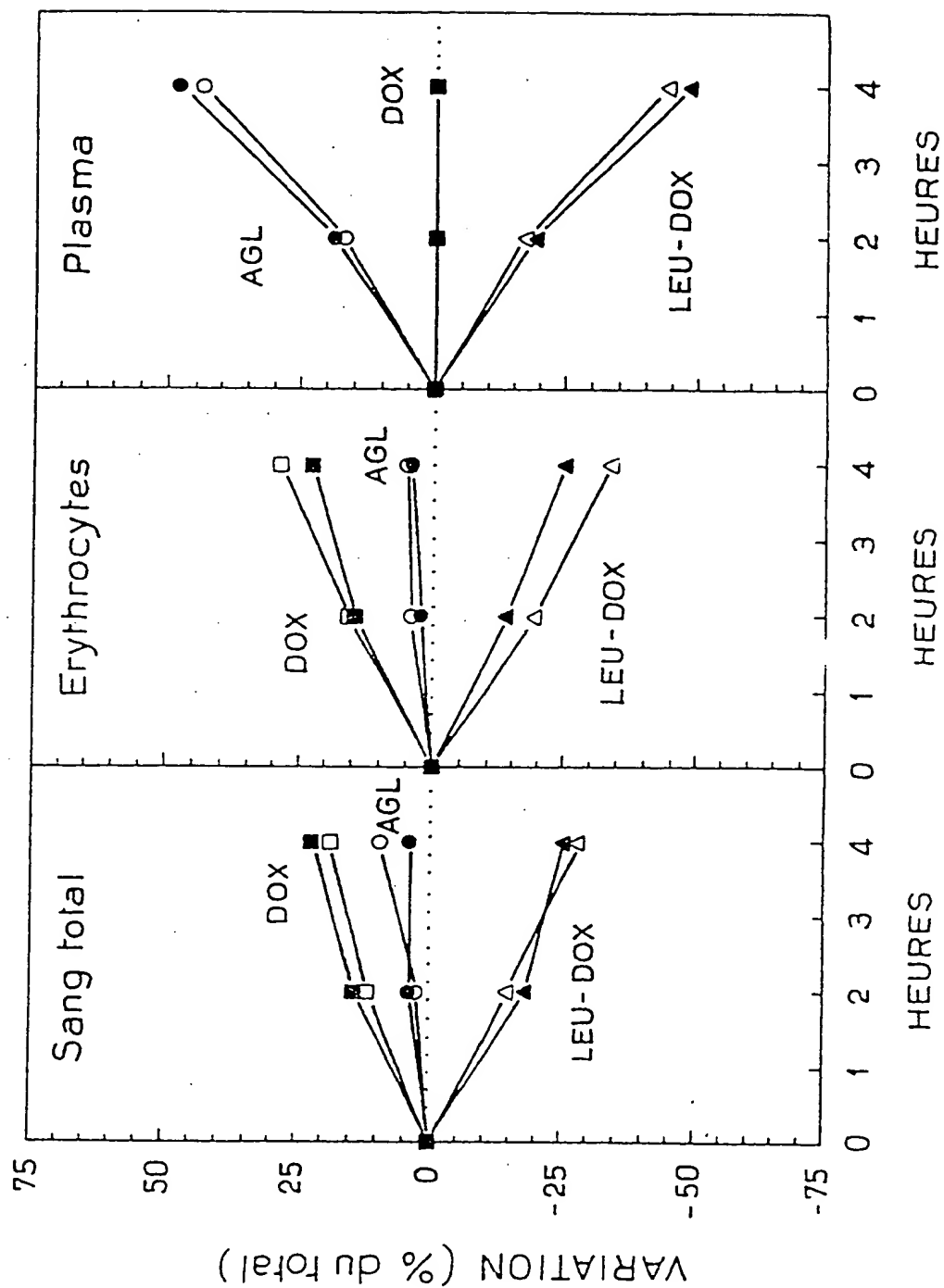


FIG. 4

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9107780
FA 460831

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	BE-A-869 485 (INSTITUT INTERNATIONAL DE PATHOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE)	1-3
Y	* page 4, ligne 9 - ligne 13; revendications 1,4; exemples *	1-3
Y	--- JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 18, no. 7, 1975, WASHINGTON US pages 703 - 707; F. ARCAMONE ET AL: 'Synthesis and Antitumor Properties of New Glycosides of Daunomycinone and Adriamycinone' * page 704 *	1-3
A	--- FR-A-2 264 554 (SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA S.P.A.) -----	1-3
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C07H A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examiné par
03 MARS 1992		DAY G. J.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE (S) OR EXHIBIT (S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image problem Mailbox.